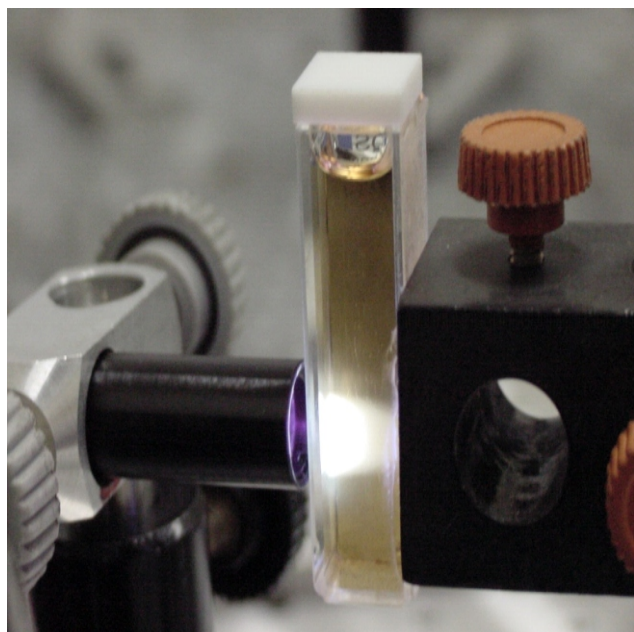


Foto: Arquivo



## Determinação do Grau de Humificação de Ácido Húmico de Solo Através da Espectroscopia de Fluorescência

Débora Marcondes Bastos Pereira Milori<sup>1</sup>  
Ladislau Martin Neto<sup>2</sup>  
Cimélio Bayer<sup>3</sup>  
João Mielniczuk<sup>4</sup>

As substâncias húmicas (SH), o maior reservatório terrestre de carbono orgânico na Terra, tem um papel importante na fertilidade e na estabilização de agregados do solo. Embora possuam um alto grau de resistência a biodegradação no solo, elas degradam, e o estado estacionário da síntese é atingido através de um decaimento característico, o qual depende do tipo de solo e da forma que é manejado (Hayes and Malcolm, 2001).

A matéria orgânica de solos (MOS) originada de lugares cultivados apresenta um estágio de humificação mais avançado do que solos sob vegetação nativa (Bayer, 1996). O aumento do grau de humificação da MOS ocorre devido a mudanças no regime microclimático do solo e pela quebra de agregados no sistema de manejo convencional (Balesdent et al., 2000).

Neste sentido, o plantio direto diminui a taxa de decomposição da MOS com efeito positivos sobre o seu grau de humificação (Bayer et al., 2000; Bayer et al., 2001). Como consequência, ocorre uma melhora nas propriedades físicas, químicas e biológica do solo.

O método mais apropriado para medir grau de humificação é ainda tema de discussão, pois não há um modelo bem definido para a estrutura das substâncias húmicas.

Entretanto, o processo de humificação tem sido estudado através das mudanças químicas e estruturais de resíduos de colheita durante o processo de decomposição, bem como o efeito do uso e manejo do solo sobre as características da matéria orgânica. Neste sentido, Zech et al. (1997) avaliaram o avanço no processo de humificação de resíduos de colheita utilizando espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de  $^{13}\text{C}$  (CPMAS), e observaram o aumento de C-carboxílico, C-alquil, C-aromático (principalmente grupos fenólicos), e decréscimo de C O-alquil. Em geral, as mudanças que ocorrem em resíduos vegetais ou na MOS durante o processo de humificação podem ser relacionadas a uma oxidação preferencial polissacarídeos, seletiva preservação de compostos orgânicos recalcitrantes como ligninas e estruturas fenólicas, e incorporação de compostos orgânicos de origem microbiológica (Zech et al., 1997).

Portanto, usualmente o grau de humificação é avaliado através de medidas indiretas que refletem as mudanças estruturais que ocorrem durante o processo de humificação. A espectroscopia de RMN tem sido utilizada na análise de solos medindo-se grau de aromaticidade das substâncias húmicas, a qual tem sido relacionada diretamente ao grau de humificação das substâncias

<sup>1</sup> Pesquisadora, Física, Dra., Embrapa Instrumentação Agropecuária, C.P. 741, CEP 13560-970, São Carlos, SP, debora@cnpdia.embrapa.br

<sup>2</sup> Pesquisador, Físico, Dr., Embrapa Instrumentação Agropecuária, C.P. 741, CEP 13560-970, São Carlos, SP, martin@cnpdia.embrapa.br

<sup>3</sup> Prof. Dr. da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Solos, Caixa Postal 776, 90001-970, Porto Alegre-RS, Brasil

<sup>4</sup> Prof. Dr. da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Solos, Caixa Postal 776, 90001-970, Porto Alegre-RS, Brasil

húmicas. Acredita-se que estruturas aromáticas condensadas e complexas estabilizem radicais livres semiquinonas em húmus (Riffaldi and Schnitzer, 1972; Wikander and Norden, 1988; Senesi, 1990 a, b) e assim a sua concentração, a qual pode ser determinada por espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE), correlaciona-se com o avanço no estágio de humificação (Martin-Neto et al., 1998; Bayer et al., 2000).

Tanto RPE quanto RMN são técnicas fundamentais usadas no estudo da estrutura e humificação da matéria orgânica, entretanto ela nem sempre são acessíveis porque são técnicas complexas e caras. Nos últimos anos, a espectroscopia de fluorescência tornou-se amplamente reconhecida como uma técnica relativamente simples, sensível e útil no estudo de estrutura química e de grupos funcionais de amostras do meio ambiente, tais como, ácido húmico (AH) de solos (Senesi, 1990b; Senesi et al., 1991; Miano and Senesi, 1992; Pullin and Cabaniss, 1995). Seu uso é sustentado pela existência, já estabelecida, de várias estruturas fluorescentes intrínsecas das moléculas de substâncias húmicas. Neste sentido, Miano and Senesi (1992) relataram que os mais eficientes fluoróforos dos polímeros húmicos são anéis aromáticos, aromáticos substituídos, aromáticos condensados e/ou cadeias alifáticas altamente insaturadas. Adicionalmente, a fluorescência das amostras de AH em solução são dependentes de um alto número de parâmetros, tais como, origem e peso molecular do ácido húmico, pH, força iônica, temperatura e potencial redox do meio, e da interação do AH com íons metálicos (Senesi, 1990b).

Além do mais, muitos pesquisadores demonstraram o potencial da espectroscopia de fluorescência par avaliar a humificação e o tamanho molecular das substâncias húmicas (Belin et al., 1993; Spark and Swift, 1994; Zsolnay et al., 1999; Kalbitz et al., 1999). Esta técnica quando aplicada com este propósito, apresenta algumas vantagens sobre a RPE e a RMN no que se refere a sua simplicidade, menor custo de equipamento e maior sensibilidade. Este comunicado pretende mostrar a eficiência da técnica de fluorescência através da análise de dezoito ácidos húmicos extraídos de quatro solos brasileiros (argissolo vermelho, latossolo vermelho 1, latossolo vermelho 2 e argissolo amarelo), sob diferentes sistemas de uso e manejo do solo, com a proposta de se obter uma ampla faixa de valores de grau de humificação. Utilizamos a concentração de radicais livres semiquinonas, determinada por RPE, como referência do grau de humificação.

#### Amostras de solo

Este estudo foi realizado com dezoito amostras de ácido húmico extraídas de quatro solos brasileiros subtropicais sob diferentes condições climáticas, e diferentes textura e mineralogia (Tabela 1).

Com o objetivo de se obter uma ampla faixa de variação de grau de humificação, foram coletadas amostras de solo superficiais (0 a 25 mm) de áreas de longo tempo de experimento (> 5 anos). Foram coletadas, também, amostras de alguns locais adjacentes sob pastagens e

mata nativa para serem usados como referencia da condição natural. Na tabela 2 é apresentada uma descrição dos sistemas de uso e manejo do solo. Informações detalhadas sobre os experimentos estão disponíveis em Bayer et al. (2000; 2001) e Bayer (1996).

Tabela 1 - Média anual de temperatura e precipitação pluviométrica, e características químicas e físicas dos quatro solos brasileiros.

Características Edafoclimáticas	Argissolo Vermelho	Latossolo Vermelho 1	Latossolo Vermelho 1	Argissolo Amarelo
Temperatura média (°C)	19,4	16,6	21,2	19,3
Precipitação (mm ano <sup>-1</sup> )	1440	2061	1713	1769
Tamanho de partícula (g kg <sup>-1</sup> )				
areia	540	167	80	730
silte	240	425	240	120
argila	220	407	680	150
Minerais da argila				
Óxidos de ferro (g Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> kg <sup>-1</sup> )	109	70	274	87
Caulinita (g kg <sup>-1</sup> )	720	nd	710	830

nd: não determinado

Tabela 2 - Número de identificação dos ácidos húmicos (AHs) extraídos dos quatro solos brasileiros sob diferentes sistemas de uso e manejo do solo durante período de tempo variado.

Amostra de AH/ Número	Classificação do Solo	Uso/preparo do solo	Sistema de cultura	Anos
AH 01	Argissolo amarelo	Convencional	Aveia/milho	5
AH 02			Aveia/milho	9
AH 03			Aveia + ervilhaca/milho + feijão-de-vaca	5
AH 04			Aveia + ervilhaca/milho + feijão-de-vaca	9
AH 05		Plantio Direto	Aveia/milho	5
AH 06			Aveia + ervilhaca/milho + feijão-de-vaca	9
AH 07			Aveia + ervilhaca/milho + feijão-de-vaca	5
AH 08			Aveia + ervilhaca/milho + feijão-de-vaca	9
AH 09	Latossolo vermelho 1	Mata nativa	-	-
AH 10		Pastagem	-	20
AH 11		Convencional	trigo/soja	50
AH 12		Plantio Direto	trigo/soja	10
AH 13	Latossolo vermelho 2	Mata nativa	-	-
AH 14		Convencional	trigo/soja	17
AH 15		Plantio Direto	trigo/soja	17
AH 16		Plantio Direto	rotação de cultura	17
AH 17	Argissolo amarelo	Pastagem	-	30
AH 18		Plantio Direto	solo descoberto	5

#### Extração e purificação das substâncias húmicas

As amostras de solo foram secas ao ar, moídas e peneiradas (<0,105 mm). As substâncias húmicas solúveis foram extraídas com uma solução de NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup> (razão 1:5 solo:extrator; 3 horas com agitador horizontal). Em seguida esta solução foi acidificada com HCl para o pH 2,0 e mantida em repouso por 24 h visando a precipitação do ácido húmico. A solução foi, então, centrifugada (5000 rpm por 30 min.) e o precipitado foi tratado com uma solução HCl/HF 1:1 mantida a agitação por 2 h, processo que foi repetido três vezes visando reduzir o teor de cinzas. O precipitado foi lavado com água destilada até teste negativo de cloreto.

### Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

O espectro de ressonância paramagnética eletrônica das amostras de ácido húmico foi medido à temperatura ambiente em um espectrômetro de RPE da Varian operando na banda X em frequência de 9 GHz. A área relativa dos radicais livres semiquinonas foi obtida usando a aproximação: intensidade  $\propto H^2$  (Senesi, 1990a; Martin-Neto et al., 1994, 1998). A concentração absoluta dos radicais livres foi calculada usando um cristal de Rubi como padrão secundário, calibrado com um "strong pitch", referência conhecida de conteúdo de radicais livres, de acordo com o Método de Singer (Singer, 1959; Martin-Neto et al., 1994). Neste estudo, a espectroscopia de RPE foi considerada como técnica referência para avaliar o grau de humificação das amostras de AH de solo.

### Espectroscopia de Fluorescência

As amostras de ácido húmico foram dissolvidas em uma solução de  $\text{NaHCO}_3$  0,05 mol  $\text{L}^{-1}$ . Para determinar a concentração ideal para este tipo de experimento, foi analisado, previamente, o comportamento da intensidade de fluorescência com excitação em 240 nm como função da concentração. Começando de baixas concentrações (0,5 mg  $\text{L}^{-1}$ ) o crescimento da curva foi quase linear, entretanto a partir de 20 mg  $\text{L}^{-1}$  a intensidade começou a reduzir exponencialmente até praticamente se extinguir em altas concentrações (acima de 1000 mg  $\text{L}^{-1}$ ). Este comportamento é originado por um efeito de filtro interno causado pela absorção da luz emitida realizada pelo próprio ácido húmico. Baseados nesta observação optou-se trabalhar com a concentração de 20 mg  $\text{L}^{-1}$  para minimizar este efeito e reduzir interações entre as moléculas (Mobed et al., 1996). Entre os pHs 7 e 9 não foi observado variações significativas no espectro, portanto foi adotado para trabalho a faixa de pH em torno de 8.

Os espectros de fluorescência das amostras foram medidos em três modos: emissão, excitação, e varredura síncrona, utilizando-se um espectrômetro de luminescência da Perkin Elmer modelo LS-50B. Em todos os experimentos as fendas de excitação e emissão foram mantidas em 7 nm e a velocidade de varredura utilizada foi 200 nm  $\text{min}^{-1}$  para ambos os monocromadores.

Com o intuito de utilizar o método de Zsolnay et al. (1999), os espectros de emissão das amostras de ácido húmico foram obtidos com excitação em 240 nm. A faixa de varredura destes espectros foi de 350–650 nm. O espectro de emissão total foi dividido em quatro partes e o grau de humificação foi calculado através da razão entre as áreas do último quarto (570–641 nm) e primeiro quarto (356–432 nm),  $A_4/A_1$ . A idéia básica de Zsolnay e colaboradores é que a humificação da M.O. leva à condensação de anéis aromáticos e este processo faz com que a fluorescência deste grupo se desloque para o vermelho (Haken and Wolf, 1995; Kumke et al., 1995). Portanto, a área do último quarto corresponde a fluorescência de estruturas mais humificadas e a área do primeiro quarto seriam oriundas de estruturas mais simples.

Para utilizar a proposta de Kalbitz et al. (1999), medimos o espectro de varredura síncrona na região entre 300–520 nm com  $\lambda_{\text{em}} - \lambda_{\text{exc}} = 55$  nm. De acordo com Kalbitz et al. (1999), o espectro de varredura síncrona das SH apresenta dois picos em torno de 360 and 400 nm, e um ombro em torno de 470 nm. A intensidade destes picos mudam dependendo do grau de humificação da amostra. A região do espectro com comprimentos de onda mais para o vermelho (maior comprimento de onda) é associada a núcleos aromáticos substituídos e/ou conjugados, ou sistemas insaturados conjugados com elétron bastante delocalizado. A região mais para o azul (menor comprimento de onda) é associada a compostos mais simples. Assim, a razão entre a intensidade de fluorescência em 400 e 360 nm, ou 470 e 360 nm pode ser utilizada para medir o grau de humificação das SH dissolvidas.

O método proposto por Milori et al. (2002) consiste em excitar as SH com luz azul e medir a emissão de fluorescência. Esta absorção é mais ressonante com estruturas cuja concentração aumenta com o avanço do processo de humificação da MO. Portanto, nesta proposta a área total sob o espectro de emissão de fluorescência com excitação em 467 nm (em condições experimentais idênticas: concentração = 20 mg  $\text{L}^{-1}$ , pH = 8 e mesma força iônica), deve ser proporcional ao grau de humificação.

### Avaliação do grau de humificação por RPE

A faixa de variação da concentração de radicais livres do tipo semiquinona (CRLS) foi de  $1,90 \times 10^{17}$  a  $14,75 \times 10^{17}$  spins  $\text{g}^{-1}$  AH (Tabela 3). Esta grande variação dos valores da CRLS dos AH de solos caracteriza uma grande variação de grau de humificação, como determinado por Martin-Neto et al. (1998) e Bayer et al. (2000). Esta correlação entre a concentração de radicais livres semiquinonas e o grau de humificação é sustentada pela estabilização de radicais livres tipo semiquinonas por estruturas complexas e aromáticos condensados (Senesi, 1990a, b) através de síntese microbiana e/ou condensação extracelular das substâncias húmicas (Sollins et al., 1996).

Para os quatro solos brasileiros, o uso e manejo do solo tiveram muita influência sobre o grau de humificação do AH do solo, como foi observado pela espectroscopia de RPE (Tabela 3). O valor mais baixo da CRLS ocorreu para solos de mata ( $1,90 \times 10^{17}$  a  $7,50 \times 10^{17}$  spins  $\text{g}^{-1}$  AH) e pastagens ( $2,30 \times 10^{17}$  a  $4,64 \times 10^{17}$  spins/g AH). Em solos agrícolas, o AH de solos em plantio direto mostraram-se menos humificados ( $2,41 \times 10^{17}$  a  $13,30 \times 10^{17}$  spins  $\text{g}^{-1}$  AH) do que os AHs extraídos de solo em preparo convencional ( $5,68 \times 10^{17}$  a  $14,75 \times 10^{17}$  spins  $\text{g}^{-1}$  AH), com prováveis benefícios no que diz respeito às propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (Bayer et al., 2000). No plantio direto, o valor mais baixo para a CRLS ocorreu sob sistemas de cultura com alto aporte de resíduo vegetal.

### Grau de Humificação do AH do solo determinado pelos métodos de Zsolnay e Kalbitz

O espectro de emissão de fluorescência do AH do solo foi

medido com excitação em 240 nm para calcular o índice de humificação  $A_4/A_1$ , como proposto por Zsolnaly et al. (1999). Neste caso, muitos tipos de estruturas fluorescentes são excitadas. Os espectros obtidos apresentam diferenças significativas para os diferentes tipos de solos e manejo. O AH do solo originado do manejo convencional, que favorece o processo de humificação, apresentou um espectro de emissão largo com um deslocamento para o vermelho quando comparado com o solo de mata nativa e pastagem (baixa humificação), como mostrado na figura 1. O índice de humificação  $A_4/A_1$  do AH do solo foi calculado através da razão entre o último quarto do espectro de emissão (570 a 641 nm) e o primeiro quarto (356 a 432 nm). Os valores estão mostrados na tabela 3. Os valores mais baixos ocorreram para solos não cultivados, e os valores mais altos para os solos sob manejo convencional.

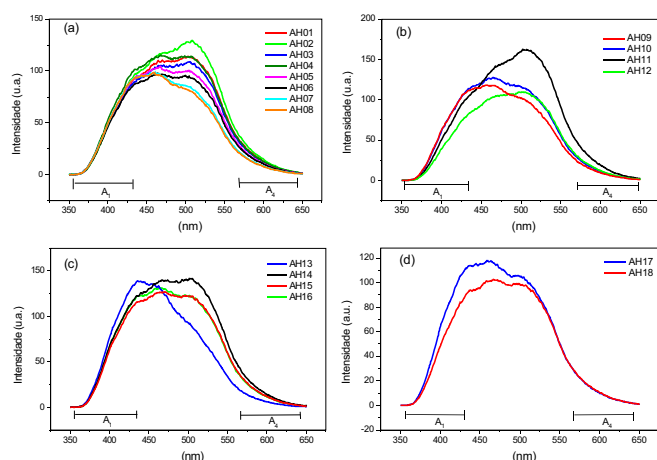


FIG. 1 Espectros de emissão de fluorescência para os ácido húmicos listados na tabela 2 com excitação em 240 nm. (a) Argissolo Vermelho, (b) Latossolo Vermelho 1, (c) Latossolo Vermelho 2, (d) Argissolo Amarelo. A1 e A4 representam as áreas utilizadas para o cálculo do índice de humificação proposto Zsolnay et al. (1999).

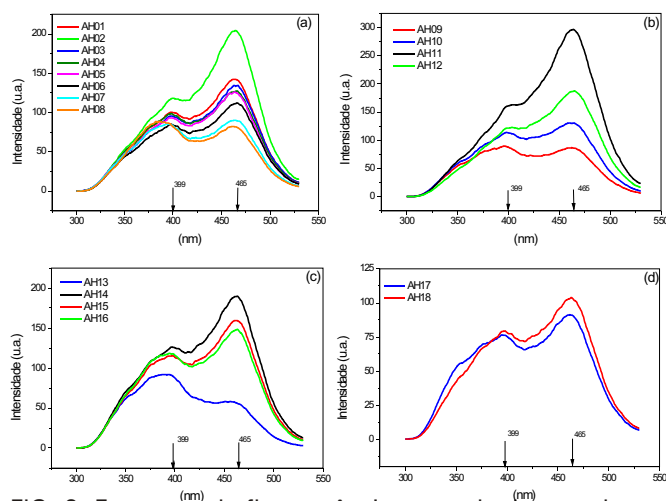


FIG. 2 Espectros de fluorescência no modo de varredura síncrona para os ácido húmicos listados na tabela 2 com  $\lambda_{exc} = 55$  nm. (a) Argissolo Vermelho, (b) Latossolo Vermelho 1, (c) Latossolo Vermelho 2, (d) Argissolo Amarelo.  $I_{399}$  e  $I_{465}$  são as intensidade utilizadas para o cálculo do índice de humificação proposto por Kalbitz et al. (1999).

A fim de utilizar o método de Kalbitz et al. (1999), mediu-se o espectro de varredura síncrona dos AH (Figura 2). Nestes espectros foram identificados claramente dois picos principais, um em 399 nm e outro em 465 nm. Portanto, o índice de humificação foi calculado através da razão da intensidade destes picos (Tabela 3). Os valores de  $I_{465}/I_{399}$  para solos sob plantio direto foram sistematicamente menores do que os do solo em preparo convencional.

Tabela 3 - Concentração de radicais livres semiquinonas (CRLS), razão entre as áreas ( $A_4/A_1$ ) do espectro de emissão de fluorescência com excitação em 240 nm (Zsolnay et al., 1999), razão da intensidade dos picos em 465 e 399 nm do espectro de varredura síncrona ( $I_{465}/I_{399}$ ) (Kalbitz et al., 1999), e área sob o espectro de fluorescência com excitação em 465 nm ( $A_{465}$ ) (Milori et al, 2002), dos dezoito ácidos húmicos extraídos de quatro solos brasileiros sob diferentes usos, manejos e sistemas de cultivo.

Solo/amostra AHs	CRLS (x 10 <sup>17</sup> /g AH)	$A_4/A_1$	$I_{465}/I_{399}$	$A_{465}$ (unidades arbitrárias)
<b>Argissolo Vermelho</b>				
AH 01	7.79	0.271	1.420	11.029
AH 02	14.00	0.304	1.726	15.712
AH 03	7.98	0.259	1.396	10.245
AH 04	11.75	0.244	1.284	9.841
AH 05	6.64	0.222	1.345	9.543
AH 06	2.41	0.224	1.309	8.573
AH 07	5.00	0.170	1.053	6.897
AH 08	2.89	0.162	0.926	6.409
<b>Latossolo Vermelho 1</b>				
AH 09	1.90	0.159	0.970	6.628
AH 10	2.89	0.191	1.150	10.085
AH 11	5.68	0.372	1.844	22.940
AH 12	5.23	0.307	1.526	14.333
<b>Latossolo Vermelho 2</b>				
AH 13	7.50	0.085	0.630	4.287
AH 14	14.75	0.226	1.506	14.158
AH 15	13.30	0.201	1.385	11.822
AH 16	11.05	0.184	1.258	10.923
<b>Argissolo Amarelo</b>				
AH 17	4.64	0.171	1.189	6.900
AH 18	6.30	0.225	1.309	7.863

Os valores dos índices  $A_4/A_1$  e  $I_{465}/I_{399}$  seguiram a mesma tendência, e foram consistentes com o comportamento observado pela CRLS determinada por RPE. O coeficiente de correlação entre os dois procedimentos propostos por Zsolnay et al. (1999) e Kalbitz et al. (1999) foi bastante alto ( $R = 0,94$  com  $P < 0,0001$ ) como mostrado na figura 3.

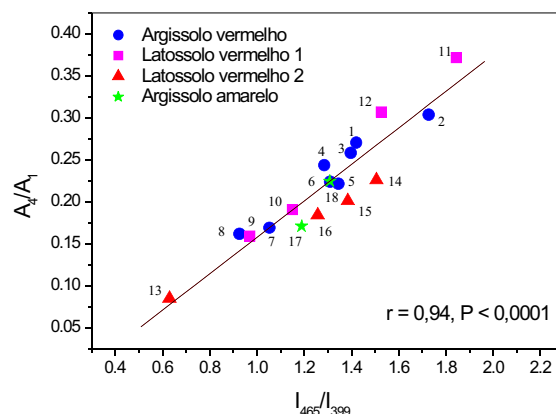


FIG. 3 - Correlação entre os métodos propostos Zsolnay et al. (1999) e Kalbitz et al. (1999) para os dezoito AH de solo brasileiro sob diferentes usos, manejos e sistemas de cultivo. Os números identificam as amostras de ácido húmico como listado na tabela 2.



### Método proposto para avaliação do grau de humificação utilizando fluorescência

O espectro de excitação do AH com emissão em 517 nm foi medido com o intuito de se avaliar qual o melhor comprimento de onda no azul para excitar sua fluorescência (Figura 4). Estes espectros apresentaram algumas estruturas e o máximo mais intenso ocorreu em 465 nm. Esta banda está, provavelmente, associada com estruturas mais humificadas, porque é a banda mais deslocada para o vermelho e é mais intensa para as amostras de AH originadas de solos sob manejo convencional. Desta forma, foi utilizado o comprimento de onda de excitação em 465 nm para medir o espectro de emissão.

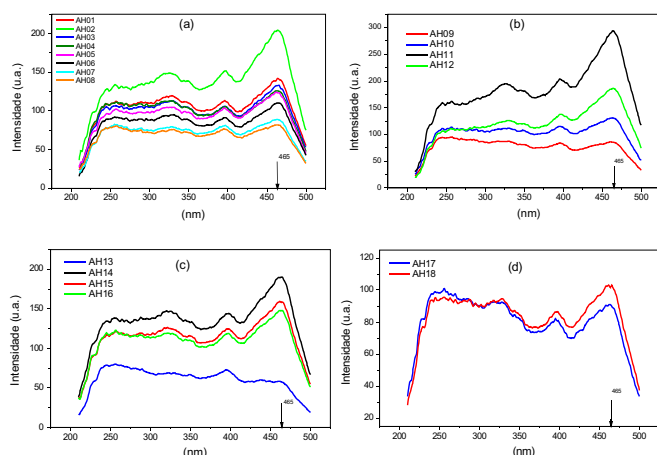


FIG. 4 Espectros de excitação de fluorescência dos ácidos húmicos de solo listados na tabela 2 com emissão em 517 nm. (a) Argissolo Vermelho, (b) Latossolo Vermelho 1, (c) Latossolo Vermelho 2, (d) Argissolo Amarelo.

É interessante observar que as amostras de AH consideradas mais humificadas, segundo os métodos propostos por Zsolnay et al. (1999) e Kalbitz et al. (1999), são as que apresentam maior intensidade em 465 nm. Outra observação interessante é que as variações de intensidade são mais significativas para excitação em 465 do que para 240 nm, sugerindo novamente que este comprimento de onda seja o ponto chave das estruturas mais humificadas.

Os espectros de emissão com excitação em 465 nm apresentaram somente variação em intensidade (Figura 5). Os mais fluorescentes eram os que possuíam uma maior CRLS. Como este espectro de emissão é bastante simétrico e para eliminar problemas com pequenos deslocamentos do máximo da banda, o parâmetro área total sob o espectro de emissão foi utilizado como um novo índice de humificação ( $A_{465}$ ). Esta definição só pode ser utilizada quando alguns parâmetros importantes encontram-se controlados, tais como: concentração, pureza, solvente e pH. Os resultados estão mostrados na tabela 3.

Quando comparadas as amostras, os valores mais altos do  $A_{465}$  ocorreram em AH extraídos de solos sob manejo convencional, seguidas do plantio direto, pastagem e mata nativa. Observou-se também uma alta correlação

entre a metodologia do  $A_{465}$  (Milori et al., 2002) e as propostas por Zsolnay et al. (1999) ( $r=0,88$ ,  $P<0,0001$ ) e Kalbitz et al. (1999) ( $r=0,90$ ,  $P<0,0001$ ), ambas mostradas na Figura 6.

É importante enfatizar que os três métodos baseados na espectroscopia de fluorescência são diferentes. Enquanto Zsolnay usa excitação no ultravioleta, onde vários fluoróforos das SHs são excitados, a proposta de Milori et al. (2002) exclui grande parte deles, atuando em grupos específicos, sendo portanto mais seletiva. A diferença entre estes grupos pode ser visualizada através do formato dos espectros de emissão com excitação em 240 nm (Figura 1) e 465 nm (Figura 5). Vale a pena lembrar aqui dois critérios básicos para análise de materiais orgânicos através de fotoluminescência (a) a fluorescência sempre parte do estado singlete de menor energia, (b) o espectro de emissão de uma substância pura independe do comprimento de onda da excitação (Parker, 1968). Desta forma é evidente que há a interação com diferentes fluoróforos quando se varia o comprimento de onda da excitação.

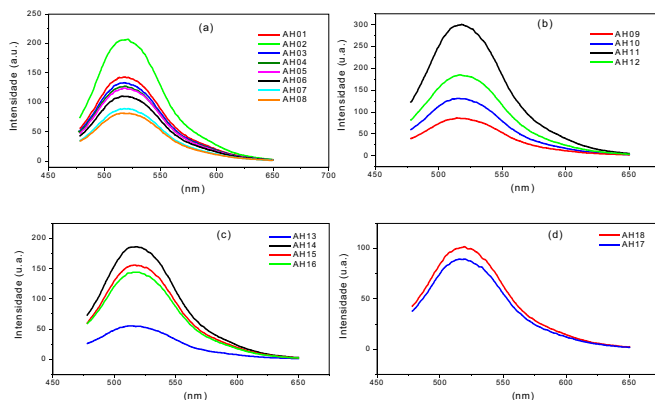


FIG. 5 - Espectros de emissão de fluorescência dos ácidos húmicos de solo listados na tabela 2 com excitação em 465 nm. (a) Argissolo Vermelho, (b) Latossolo Vermelho 1, (c) Latossolo Vermelho 2, (d) Argissolo Amarelo.

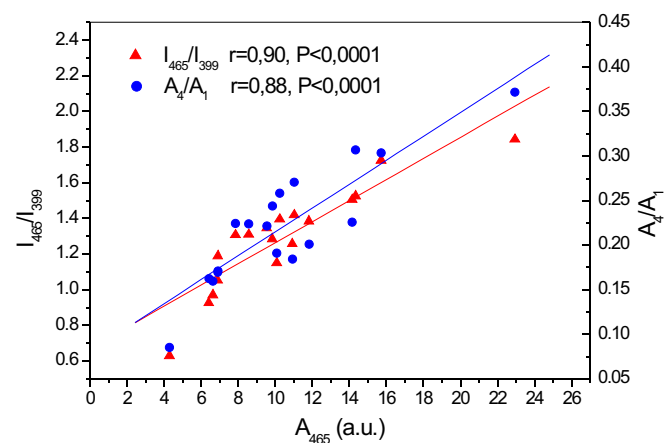


FIG. 6 Correlação entre as técnicas que utilizam fluorescência para a determinação do grau de humificação de SH.  $A_4/A_1$  é o índice proposto por Zsolnay et al. (1999);  $I_{465}/I_{399}$  é o índice proposto por Kalbitz et al. (1999); e  $A_{465}$  é o índice proposto por Milori et al. (2002).

O método proposto por Kalbitz também é mais seletivo do que o proposto por Zsolnay pois mostra ressonâncias específicas quando a diferença entre o comprimento de onda da excitação e da emissão ( ) é igual a 55 nm. Ele também difere da proposta de Milori et al. (2002) pois interage principalmente com dois grupos, um com excitação em 399 nm e emissão em 454 nm, a qual Kalbitz associa com grupos menos humificados, e outro com excitação em 465 nm com emissão em 520 nm, que estaria associado a grupos mais humificados.

O método escolhido como referência foi a CRLS medida por RPE, em função do seu uso já consolidado para análises de grau de humificação de substâncias húmicas. A correlação entre o índice de humificação A<sub>465</sub> e a CRLS é apresentada na figura 7. Para cada grupo de solos ( Argiloso vermelho, Latossolo vermelho 1, Latossolo vermelho 2 e Argissolo amarelo) foi observado uma correlação significativa superior a 84%.

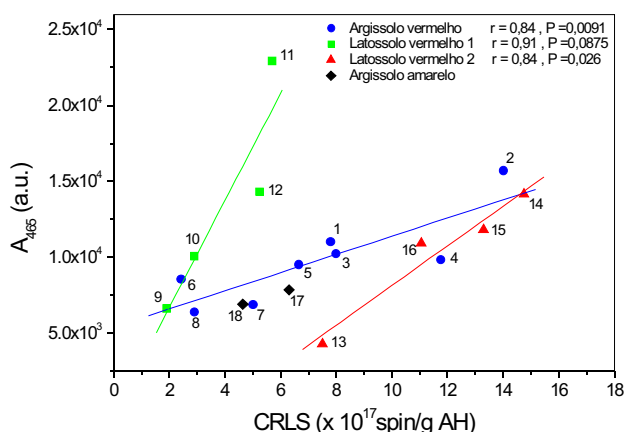


FIG. 7 Correlação entre a concentração dos radicais livres semiquinonas, medida através da RPE, e o método utilizando fluorescência proposto por Milori et al (2002). Os números identificam as amostras de ácido húmico como listado na tabela 2.

Grupos fenólicos formados durante o processo de degradação da matéria orgânica (Zech et al., 1997), passam por uma oxidação durante o processo de humificação produzindo estruturas do tipo quinonas. Estas estruturas, predecessoras dos radicais livres semiquinonas, podem apresentar fluorescência, e como com a evolução do processo de humificação a concentração de estruturas do tipo quinonas aumenta, a fluorescência das SH deve aumentar com aumento do grau de humificação das SHs. Experimentos realizados com resorcinol em solução aquosa mostraram diferenças interessantes nos espectros de emissão de fluorescência para as excitações em 240 e 465 nm: (a) para a excitação em 240 nm a intensidade do espectro de emissão decresce com o pH, (b) para a excitação em 465 nm a intensidade do espectro de emissão aumenta com o pH. Em pHs altos (~12), o resorcinol assume uma forma estrutural do tipo quinona que é altamente fluorescente para excitação em 465 nm e não fluoresce quando excitada em 240 nm. Este é provavelmente o ponto de correlação entre as técnicas de RPE e o método proposto por Milori et al. (2002).

O índice de humificação medido por espectroscopia de fluorescência utilizando a metodologia proposta por Milori et al. (2002) mostrou uma boa concordância com o número de radicais livres semiquinonas medidos por EPR (figura 7) quando analisado por grupos de amostras extraídas de um mesmo solo. Entretanto, a correlação entre A<sub>465</sub> e CRLS para todas as amostras juntas foi baixa. A hipótese mais provável para explicar este resultado é a possível interferência de metais paramagnéticos nas análises feitas por espectroscopia de RPE, como já foi demonstrado por Jezierski et al. (2000) e, Novotny e Martin-Neto (2002).

Os métodos que utilizam espectroscopia de fluorescência são interessantes pois são mais rápidos, relativamente mais baratos e acessíveis a um grande número de laboratórios quando comparados a outros procedimentos para avaliar grau de humificação, tais como RPE e RMN.

### Considerações Finais

Diferenças significativas foram observadas entre os espectros de fluorescência de AHs extraídos de um mesmo solo submetido a diferentes uso e manejo. Quando excitados no ultravioleta (240 nm), a emissão dos AH extraídos de solo sob pastagem e mata nativa apresentaram um máximo na região do azul em (~450 nm), enquanto que AHs extraídos de solos sob manejo convencional apresentam um espectro mais largo e com máximo na região do verde (~507 nm).

Os espectros de excitação síncrona mostraram uma inversão de intensidade dos máximos em 465 e 399 nm quando compara-se AH extraídos de mata nativa e manejo convencional. Este resultado e os espectros de excitação são indícios de que a emissão acima de 500 nm e a excitação em 465 nm estão mais relacionadas com estruturas humificadas.

Em relação ao espectro de emissão com excitação em 465 nm, o perfil permanece o mesmo para os diferentes sistemas de uso e manejo, mas foram observadas variações significativas na intensidade. Baseados nestas observações definiu-se um índice de humificação de AH como sendo a área sob a curva de emissão para uma solução de 20 mgL<sup>-1</sup> em NaCO<sub>3</sub> na faixa de pH próximo a 8.

A comparação entre o índice A<sub>465</sub> e a CRLS mostrou que a proposta apresentada por Milori et al. (2002) é eficiente. A excitação mais ressonante com estruturas mais humificadas (excitação em 465 nm) produz uma emissão mais seletiva com informação mais "limpa" destas estruturas. Esta informação é importante para se avaliar a qualidade do manejo do solo e pode ser útil para estudos a respeito de seqüestro de carbono no solo.

Concluindo, a espectroscopia de fluorescência demonstrou ser uma ferramenta útil para avaliar o efeito do uso e manejo do solo sobre o grau de humificação da MO. As mudanças na estrutura do AH do solo depois de um curto período de manejo, como por exemplo 5 anos, pode ser facilmente detectada através desta técnica.

## Referências Bibliográficas

- BALESDENT, J.; CHENU, C.; BALABANE, M. Relationship of soil organic matter dynamics to physical protection and tillage. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 53, p. 215-230, 2000.
- BAYER, C. **Dinâmica e qualidade da matéria orgânica em solos e sistemas de manejo**. 1996. 241 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; MIELNICZUK, J.; CERETTA, C. A. Effect of no-till cropping systems on soil organic matter in a sandy clay loam Acrisol from Southern Brazil monitored by electron spin resonance and nuclear magnetic resonance. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 53, p. 95-104, 2000.
- BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; MIELNICZUK, J.; PILLON, C. N.; SANGOI, L. Changes in soil organic matter fractions under subtropical no-till cropping systems. **Soil Science Society of America**, Madison, v. 65, p. 1473-1478, 2001.
- BELIN, C.; QUELLEC, C.; LAMOTTE, M.; EWALD, M.; SIMON, PH. Characterization by fluorescence of the dissolved organic matter in natural water. Application to fractions obtained by tangential ultrafiltration and xad resin isolation. **Environmental Technology**, London, v. 14, p. 1131-1144, 1993.
- HAKEN, H.; WOLF, H. C. **Molecular Physics and Elements of Quantum Chemistry**. Heidelberg, DE: Springer-Verlag, 1995.
- HAYES, M. H. B.; MALCOLM, R. L. Considerations of compositions and aspects of structures of Humic Substances. In C. E. Clapp et al (ed.) **Humic Substances and Chemical Contaminants**. **Soil Science Society of America**, Madison, v. 65, p. 3-39, 2001.
- JEZIERSKI, A.; CZECHOWSKI, F.; JERZYKIEWICZ, M. ; CHEN, Y; DROZD, Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Studies on Stable and Transient Radicals in Humic Acids from Compost, Soil, Peat and Brown Coal, **Spectrochimica Acta Part A**, Oxford, p. 56-379, 2000.
- KALBITZ, K.; GEYER, W.; GEYER, S. Spectroscopic properties of dissolved humic substances a reflection of land use history in a fen area. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 47, p. 219-238, 1999.
- KUMKE, M. U.; LÖHMANNSTRÖBEN, H. G.; ROCH, T. H. Fluorescence spectroscopy of polyaromatic compounds in environmental monitoring. **Journal of Fluorescence**, Baltimore, v. 5, p. 139-153, 1995.
- MARTIN-NETO, L.; ANDRIULO, A. E.; TRAGHETTA, D. G. Effects of cultivation on ESR spectra of organic matter from soil size fractions of a mollisol. **Soil Science**, Baltimore, v. 157, p. 365-372, 1994.
- MARTIN-NETO, L.; ROSELL, R.; SPOSITO, G. Correlation of spectroscopic indicators of humification with mean annual rainfall along a temperature grassland climosequence. **Geoderma**, Amsterdam, v. 81, p. 305-311, 1998.
- MIANO, T. M.; SENESI, N. Synchronous excitation fluorescence spectroscopy applied to soil humic substances chemistry. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 117/118, p. 41-51, 1992.
- MILORI, D. M. B. P.; BAYER, C.; BAGNATO, V. S.; MIELNICZUK, J.; MARTIN-NETO, L. Fluorescence Spectroscopy as Alternative Approach to Study Humification Degree in Soil Humic Acids. In: 10th INTERNATIONAL MEETING OF THE INTERNATIONAL HUMIC SUBSTANCES SOCIETY, 2000, Toulouse(Fr). **Proceedings...** Toulouse: [s. n.], 2000. p. 97-100. v. 1.
- MILORI, D. M. B. P.; BAYER, C.; BAGNATO, V. S.; MIELNICZUK, J.; MARTIN-NETO, L. Humification degree of soil humic acids determined by fluorescence spectroscopy. **Soil Science**, Baltimore, v. 167, n. 11, p. 739-749, 2002.
- MOBED, J. J.; HEMMINGSEN, S. L.; AUTRY, J. L.; MCGOWN, L. B. Fluorescence Characterization of IHSS Humic Substances: Total Luminescence Spectra with Absorption Correction. **Environmental Science & Technology**, [S. l.], v. 30, p. 3061-3065, 1996.
- NOVOTNY, E. H.; MARTIN-NETO, L. Effects of Humidity and Metal Ions on the Free Radical Analysis of peat humus. **Geoderma**, Amsterdam, v. 106, p. 305-317, 2002.
- PARKER, C. A. **Photoluminescence of solutions**. Amsterdam: Elsevier Publ., 1968. p. 438.
- PULLIN, M. J.; CABANISS, S. E. Rank analysis of the pH-dependent synchronous fluorescence spectra of six standard humic substances. **Environmental Science & Technology**, [S. l.], v. 29, p. 1460-1467, 1995.
- RIFFALDI, R.; SCHNITZER, M. Electron spin resonance spectrometry of humic substances. **Soil Science Society of America**, Madison, v. 36, p. 301-305, 1972.
- SENESE, N. Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interaction with metal ions and organic chemicals, Part I. The electron spin resonance approach. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 232, p. 51-75, 1990a.
- SENESE, N. Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interaction with metal ions and organic chemicals, Part II. The fluorescence spectroscopy approach. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 232, p. 77-106, 1990b.
- SENESE, N.; MIANO, T. M.; PROVENZANO, M. R.; BRUNETTI, G. Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. **Soil Science**, Baltimore, v. 152, p., 259-271, 1991.
- SINGER, L. S. Synthetic Ruby as a Secondary Standard for the Measurement of Intensities in Electron Paramagnetic Resonance. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 30, p. 1463-1464, 1959.
- SOLLINS, P.; HOMANN, P.; CALDWELL, B. A. Stabilization and destabilization of soil organic matter: mechanisms and controls. **Geoderma**, Amsterdam, v. 74, p. 65-105, 1996.
- SPARK, K. M.; SWIFT, R. S. Investigation of some of the parameters affecting the fluorescence spectra of humic substances. In: SENESI, N.; MIANO, T. M. (Eds.). **Humic Substances in The Global Environment and Implications on Human Health**. Amsterdam: Elsevier Science B. V., 1994. p. 153-160.
- WIKANDER, G.; NORDEN, B. Investigations of paramagnetic species in peat. **Soil Science**, Baltimore, v. 145, p. 289-297, 1988.

ZECH, W.; SENESI, N.; GUGGENBERGER, G. K. K.; LEHMANN, J.; MIANO, T. M.; MILTNER, A.; SCHROTH, G. Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. **Geoderma**, Amsterdam, v. 79, p. 117-161, 1997.

ZSOLNAY, A.; BAIGAR, E.; JIMENEZ, M.; STEINWEG, B.; SACCOMANDI, F. Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. **Chemosphere**, Oxford, v. 38, p. 45-50, 1999.

## Comunicado Técnico, 56

Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

**Embrapa Instrumentação Agropecuária**  
Rua XV de Novembro, 1542 - Caixa Postal 741  
CEP 13560-970 - São Carlos-SP  
**Fone:** 16 3374 2477  
**Fax:** 16 3372 5958  
**E-mail:** sac@cnpdia.embrapa.br  
[www.cnpdia.embrapa.br](http://www.cnpdia.embrapa.br)

**1a. edição**

1a. impressão 2003: tiragem 300

## Comitê de Publicações

**Presidente:** Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso  
**Secretária Executiva:** Janis Aparecida Baldovinotti  
**Membros:** Dr. Odílio Benedito Garrido de Assis,  
Dr. João de Mendonça Naime,  
Dr. Rubens Bernardes Filho,  
Dr. Washington Luiz de Barros Melo  
**Membro Suplente:** Débora Marcondes B. P. Milori

## Expediente

**Supervisor editorial:** Dr. Odílio B. Garrido de Assis  
**Revisão de texto:** Janis Aparecida Baldovinotti  
**Tratamento das ilustrações:** Valentim Monzane  
**Editoração eletrônica:** Valentim Monzane